

論文の内容の要旨

氏名：三浦 一輝

博士の専攻分野の名称：博士(生物資源科学)

論文題名：タンパク質糖鎖修飾の逆行修飾を担う酵素に関する研究

真核生物で普遍的に行なわれている糖鎖を介したタンパク質の翻訳後修飾は、タンパク質の多様な機能発現を担う重要な生物学的イベントであり、小胞体およびゴルジ体に局在するさまざまな糖質加水分解酵素および糖転移酵素が本糖鎖修飾に関与している。

本研究ではヒト細胞における糖鎖修飾の1つであるN-結合型糖鎖修飾過程から2つの仮説を設定した。ヒト細胞の小胞体では、不良糖鎖修飾の修復機構として、不良タンパク質糖鎖に糖付加を行い、一段階前の糖鎖修飾過程に戻す酵素が報告されているが、ゴルジ体では小胞体に存在するような不良糖鎖修飾の修復を担う機構が報告されておらず、ゴルジ体で生じた不良糖鎖修飾がどのように修復されるかは不明である。そこで、1つ目の仮説としてゴルジ体にも小胞体に存在するような不良糖鎖修飾の修復機構が存在すると考え、ゴルジ体糖鎖修飾過程において、一段階前の糖鎖修飾過程に戻す酵素、つまり不良糖鎖修飾の修復を担う逆行の糖鎖修飾酵素として、ゴルジ体に α -または β -グリコシダーゼが存在すると仮定した。そこで、既知のN-結合型糖鎖修飾過程において本仮説を満たす酵素を確認すると、糖鎖の非還元末端には β -N-アセチルグルコサミニド結合、 β -ガラクトシド結合、 α -L-フコシド結合、 α -シアリド結合があり、それら結合をそれぞれ分解する β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 α -L-フコシダーゼ、 α -シアリダーゼの4種類の酵素を仮定した。

タンパク質の糖鎖修飾は真核生物に特有の翻訳後修飾の1つではあるが、生物種によって異なる糖鎖が糖鎖修飾には利用されている。数多くの真核生物の中でも、昆虫細胞ではヒト細胞と同一の糖質がN-結合型糖鎖修飾に利用され、N-結合型糖鎖修飾経路も同一である。昆虫細胞とヒト細胞のN-結合型糖鎖修飾を比較すると、昆虫細胞ではゴルジ体においてタンパク質糖鎖末端が β -結合の場合でも、タンパク質糖鎖への糖転移反応だけでなく、糖鎖の加水分解反応も報告されており、糖鎖の加水分解反応を担う酵素は、昆虫細胞のN-結合型糖鎖修飾において糖鎖発現量の調節を担っていると示唆されている。しかし、ヒト細胞では、タンパク質糖鎖末端が β -結合の場合でも糖鎖の加水分解反応を担う酵素の報告はなく、かつゴルジ体の糖鎖修飾は一方のみであり、昆虫細胞に存在するような糖鎖の発現量調節機構についても報告がない。それゆえ、ヒト細胞において糖鎖発現量がどのように調節されているかは不明である。そこで、2つ目の仮説としてヒト細胞のゴルジ体においても、昆虫細胞において糖鎖発現量の調節を担う酵素に相当する酵素が存在し、糖鎖の非還元末端が β -結合のときも加水分解反応による糖鎖修飾が生じると仮定した。そこで、既知のN-結合型糖鎖修飾過程において本仮説を満たす酵素を確認すると、糖鎖の非還元末端には β -N-アセチルグルコサミニド結合、 β -ガラクトシド結合があり、それら結合をそれぞれ分解する β -N-アセチルグルコサミニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼの2種類の酵素の存在を仮定した。

本研究では、仮定したこれら酵素を探索し、発見した酵素の糖鎖修飾における役割の解明を目指して、3つの研究目的を設定した。第1の研究目的として、仮定した新規糖鎖修飾酵素を探索するため、糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素を蛍光イメージング可能な蛍光基質プラットフォームの開発を研究目的とした。これら蛍光基質プラットフォームは、糖鎖修飾に関与するさまざまな糖質加水分解酵素

の活性部位構造について *in silico* で解析を行い、これら解析結果に基づいて酵素の活性部位に最適な蛍光基質構造を設計することで開発し、設計した基質を有機化学的手法により合成する。

第2の研究目的として、ヒト細胞のゴルジ体糖鎖修飾において、不良糖鎖修飾の修復機構および糖鎖発現量の調節機構を担う酵素の存在を明らかにすることを目指して、仮定した糖質加水分解酵素活性の探索および発見した酵素活性を持つ酵素の同定を試みる。標的酵素の探索は、開発した蛍光基質プラットフォームを用いた蛍光イメージングによりヒト細胞から探索し、仮定した酵素活性を発見できたならば、細胞アッセイおよび光親和性標識法により標的酵素の同定を行う。

第3の研究目的として、発見した酵素が不良糖鎖修飾の修復機構または糖鎖発現量の調節機構に関与する酵素であるかをケミカルノックダウン法により解明するため、発見した酵素に対する特異的阻害剤の探索を試みる。これら阻害剤は、開発した蛍光基質を用いた阻害剤探索系を構築したのち、本探索系を用いて公的化合物ライブラリから探索を行う。

これら3つの研究を試みることで、ヒト細胞における不良糖鎖修飾の修復または糖鎖発現量調節を担う逆行の糖鎖修飾に関係する酵素の探索が蛍光基質プラットフォームの開発で可能となり、さらに特異的阻害剤の探索によってヒト細胞のゴルジ体における不良糖鎖修飾の修復機構および糖鎖発現量の調節機構の解明が可能となる。

1. 糖鎖修飾に関与する新規糖質加水分解酵素の探索

1-1. 糖鎖修飾関連酵素の *in silico* 解析に基づく蛍光基質の分子設計および設計した蛍光基質の合成

仮定した酵素について微弱な酵素活性でも検出可能な蛍光イメージング法を用いて探索するため、まず既知の糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素の活性部位について *in silico* で解析を行った。その結果、糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素は Subsite -1 および Subsite +1 を持つ *exo* 型の糖質加水分解酵素であることが示された。そこで、これら解析結果に基づいて糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素の立体構造を考慮した精密な蛍光基質を設計することで、糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素に対する蛍光基質プラットフォームを開発した。

β -N-アセチルグルコサミニダーゼのための蛍光基質(蛍光基質 **1-3**)は全4工程、赤色蛍光基質 21%、青色蛍光基質 28%、緑色蛍光基質 31%の収率で合成した。 β -ガラクトシダーゼのための蛍光基質(蛍光基質 **4-7**)は全4工程、赤色蛍光基質 39%、青色蛍光基質 41%、緑色蛍光基質 21 - 33%の収率で合成した。 α -L-フコシダーゼのための蛍光基質(蛍光基質 **8-13**)は全7工程、赤色蛍光基質 39 - 44%、青色蛍光基質 35 - 47%、緑色蛍光基質 32 - 44%の収率で合成した。これら蛍光基質について MS、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ 、HMQC によって目的の構造であること、元素分析によって高純度で精製されていることを確認した。さらに、これら蛍光基質について各種蛍光色素の励起波長照射条件下での蛍光スペクトルを測定し、蛍光基質が各種蛍光色素の励起条件下でもほぼ消光していることも確認することで、標的酵素活性を蛍光イメージング可能な蛍光基質であることを確認した。

1-2. ヒト細胞を用いた糖鎖修飾に関与する新規糖質加水分解酵素の探索

開発した3種類の蛍光基質を各種ヒト細胞 (HT1080: 線維芽肉腫細胞、HeLa: 子宮頸部癌細胞、SK-N-SH: 神経芽細胞種) へそれぞれ投与し、仮定した酵素の探索を行った。その結果、蛍光基質 **1-3** はリソソームを染色していた。また、蛍光基質 **4-7** はゴルジ体を染色していた。さらに、蛍光基質 **8-13** はリソソームを染色していた。この結果から、蛍光基質 **4-7** によりイメージングしたゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性は仮定した新規酵素活性であり、本ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性は不良糖鎖修

飾の修復機構または糖鎖発現量の調節機構を担う逆行の糖鎖修飾酵素であることが期待される。また、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼおよび α -L-フコシダーゼについては、仮定した酵素活性はゴルジ体に見られなかったが、蛍光基質 **1-3** によりリソソーム β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性、蛍光基質 **8-13** により α -L-フコシダーゼ活性を生細胞内で蛍光イメージングすることに成功し、これら蛍光基質を用いることで β -N-アセチルグルコサミニダーゼ活性または α -L-フコシダーゼ活性を生細胞内蛍光イメージングすることが可能となった。

2. 発見した新規ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の同定

2-1. Anti-GLB1 抗体および市販の蛍光基質を用いた新規ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の同定

これまでの研究から、ヒト細胞内には小胞体に局在する *GLB1* 遺伝子から生合成された完全長前駆体 β -ガラクトシダーゼ (fpGLB1)、小胞体およびゴルジ体に局在する fpGLB1 のシグナルペプチド部分がトリミングされた前駆体 β -ガラクトシダーゼ (pGLB1)、ゴルジ体に局在する pGLB1 の C 末端側のいくつかのアミノ酸残基がトリミングされたゴルジ体局在 *GLB1 isoform 1* (Golgi-GLB1 iso1)、Golgi-GLB1 iso1 が機能発現の場へと輸送されたリソソームに局在する Lyso-GLB1 iso1、核周辺に局在する選択的スプライシングによって生合成された *GLB1 isoform 2* の 5 種類の β -ガラクトシダーゼが存在する。そこで、発見したゴルジ体 β -ガラクトシダーゼはこれらいずれかの *GLB1* に由来すると考え、fpGLB1 および pGLB1 特異的アミノ酸配列を抗原として作成された anti-GLB1 抗体または市販蛍光基質と開発した蛍光基質 **4-7** の共染色によりゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の同定を試みた。その結果、開発した蛍光基質による染色部位と免疫染色による染色部位が一致した。この結果から、発見したゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性は fpGLB1 または pGLB1 に由来することが示唆された。さらに、Lyso-GLB1 iso1 の基質になると考えられる市販蛍光基質と開発した蛍光基質による共染色を行い、染色部位を比較した。その結果、染色部位は一致しなかった。この結果から、発見したゴルジ体 β -ガラクトシダーゼは Lyso-GLB1 iso1 由来でないことが示された。以上 2 つの結果より、発見したゴルジ体 β -ガラクトシダーゼは fpGLB1、pGLB1 または Golgi-GLB1 iso1 に由来することが示唆された。

2-2. 光親和性標識法を用いた新規ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の同定

ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素を明らかとするため、光親和性標識法によりゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素の単離および同定を試みた。光親和性標識に必要な光親和性プローブは蛍光基質の構造に基づいて、全 5 工程、12%の収率で合成した。次に開発した光親和性プローブをヒト細胞である HeLa 細胞に投与し、プルダウンアッセイにより酵素の単離およびペプチドマスマ解析により酵素の同定を試みた。その結果、ヒト細胞に存在する唯一の β -ガラクトシダーゼである *GLB1* が検出されたが、fpGLB1、pGLB1、Golgi-GLB1 iso1 のすべてに共通するアミノ酸配列が検出されており、3 種類のいずれがゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素であることを明らかにすることはできなかった。しかしながら、高いアミノ酸配列網羅率でそれぞれの *GLB1* が同定されており、ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を持つ酵素は *GLB1* 由来のタンパク質であることが強く示唆された。

3. ゴルジ体 *GLB1* のケミカルノックダウンによる細胞内機能の解明を目指した特異的阻害剤の探索

3-1. 公的化合物ライブラリからのゴルジ体 *GLB1* 特異的阻害剤の探索

ゴルジ体 *GLB1* が不良糖鎖修飾の修復機構または糖鎖発現量の調節機構に関与する酵素であるかを

ケミカルノックダウン法により解明するため、ゴルジ体 GLB1 特異的阻害剤の探索系を構築し、これら探索系を用いて公的化合物ライブラリより阻害剤の探索を試みた。その結果、ゴルジ体 GLB1 の活性を特異的に阻害する計 5 種類の阻害剤を同定した。

4. 総括

本研究では、ヒト細胞内 *N*-結合型糖鎖修飾過程から 2 つの仮説を設定し、これら仮説から仮定した酵素の探索および発見した酵素の糖鎖修飾における役割の解明を目指して 3 つの研究目的を設定し、研究を行なった。第一の目的として糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素のための蛍光基質プラットフォームを開発した。本プラットフォームは糖鎖修飾に関与する新規酵素の探索に利用することが可能だけでなく、既知の糖鎖修飾酵素蛍光イメージングにも活用することが可能である。また、第二の目的として既知のヒト細胞内糖鎖修飾過程から新規糖鎖修飾酵素として、いくつかの酵素の存在を仮定し、仮定したゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を発見した。本ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性は、ヒト細胞ではこれまでに報告のない不良糖鎖修飾の修復または糖鎖発現量の調節を担う逆行の糖鎖修飾酵素であることが期待され、ヒト細胞内糖鎖修飾過程では、**trans** ゴルジ体において β -ガラクトース残基がタンパク質糖鎖末端に糖転移されることから、 β -ガラクトシダーゼのための蛍光基質 **4-7** が **trans** ゴルジ体を染色しているかを今後確認する必要がある。さらに、第三の研究目的としてゴルジ体 GLB1 特異的阻害剤の探索系を構築し、これら探索系を用いて公的化合物ライブラリよりゴルジ体 GLB1 の活性を特異的に阻害する計 5 種類の阻害剤を同定した。これら阻害剤はゴルジ体 GLB1 活性を阻害することが可能であり、本阻害剤を用いることでゴルジ体 GLB1 の機能を解明することが可能となる。しかしながら、これら 5 種類の化合物はゴルジ体 GLB1 と活性部位を構成するアミノ酸配列が同一な Lyso-GLB1 iso1 にも阻害活性を示す可能性がある。そこで、今後は発見した阻害剤が Lyso-GLB1 iso1 の酵素活性も阻害するかを確認するため、Lyso-GLB1 iso1 の基質となる市販蛍光基質を用いて Lyso-GLB1 iso1 に対する阻害活性を確認する予定である。

さらに、今後の課題として、本研究では新規ゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性を発見し、本活性がゴルジ体 GLB1 に由来することを見出したが、本酵素が細胞内でどの糖鎖を基質とするのかは不明である。そこで、ゴルジ体 GLB1 が基質とする糖鎖を明らかとする必要がある。そこで、ゴルジ体 GLB1 が基質とする糖鎖を明らかとするために、見出したゴルジ体 GLB1 特異的阻害剤を用いてゴルジ体 β -ガラクトシダーゼ活性のみを阻害した際の細胞内糖鎖プロファイルの解析を行う必要がある

最後に本研究は、これまで提唱されている *N*-結合型糖鎖修飾に対して新たな糖鎖修飾過程の存在を提唱および示唆する研究である。また、糖鎖修飾に関与する酵素はタンパク質の多様な機能発現に必要不可欠な酵素であることから、本研究で開発した糖鎖修飾に関与する糖質加水分解酵素のための蛍光基質プラットフォームを用いることで、ヒト細胞内糖鎖修飾の役割解明に大きく寄与するだけでなく、翻訳後修飾研究の発展にも大きく寄与することが可能となる。